

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09291

研究課題名（和文）破壊性脊椎関節症の脊椎病変における病態解析

研究課題名（英文）Analysis of the pathology of spondyloarthritis in the spine

研究代表者

矢部 裕（Yabe, Yutaka）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00803016

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：破壊性脊椎症は長期透析患者にみられる重大な合併症であり、進行性に骨や関節の破壊を生じる。特に脊椎に生じる病変は強い背部痛や神経障害により、患者の日常生活動作を著しく障害し、要支援・要介護の原因ともなる。脊椎周囲の軟部組織へのアミロイドの沈着がトリガーとなり、破壊性脊椎関節症を生じると推測されているが、その病態は未だ解明されていない。本研究では画像および網羅的な遺伝子・タンパク解析を行い、機械的ストレスによりアミロイドの沈着が促進し、引き続き炎症カスケードにより破壊性脊椎関節症を生じる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

透析患者の数は年々増加し、また医療技術の進歩による透析患者の平均寿命の延伸に伴い、破壊性脊椎関節症の患者数も増加しているとされる。しかしながら破壊性脊椎関節症の病態は解明されておらず、現在のところ予防・治療法は存在しない。また強い痛みや麻痺が生じた場合、神経の除圧や脊椎を固定する手術治療が行われるが、病変の進行を予測する方法もないため、手術法の選択において確立された基準がない。本研究では破壊性脊椎関節症のCT画像による詳細な分類を行い、また病態に関わる炎症カスケードを明らかとした。これらをターゲットとした新たな予防・治療法の開発や、病変の進行予測による治療方針の確立につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Destructive spondyloarthritis is a serious complication of long-term dialysis patients, resulting in progressive bone and joint destruction. Especially, lesions in the spine cause severe back pain and neuropathy that significantly impairs patients' activities of daily living and may lead to the need for support and nursing care. Amyloid deposition in the soft tissues surrounding the spine is thought to trigger destructive spondyloarthritis, however, the pathogenesis of this disease is still unknown. In this study, imaging and comprehensive gene/protein analysis showed that mechanical stress may accelerate amyloid deposition, leading to a subsequent inflammatory cascade that results in destructive spondyloarthritis.

研究分野：整形外科

キーワード：破壊性脊椎関節症 脊椎 アミロイド 2ミクログロブリン 黄色靭帯 腰椎 CT画像

1. 研究開始当初の背景

破壊性脊椎関節症は長期透析患者にみられる重大な合併症であり、進行性に骨や関節の破壊を生じる疾患である。透析患者の数は年々増加しており、本邦において現在 30 万人以上が血液透析による治療を受けている。また医療技術の進歩による透析患者の平均寿命の延伸に伴い、破壊性脊椎関節症の患者数も増加しているとされるが、画像による診断基準が確立しておらず、詳細は不明である。破壊性脊椎関節症において特に脊椎に生じる病変は骨の破壊に伴う強い背部痛や神経障害による下肢痛、麻痺を生じ、患者の日常生活動作を著しく障害させ要支援・要介護の原因ともなる。破壊性脊椎関節症では病態の首座が椎間板や靭帯、関節包といった軟部組織にあり、アミロイドの沈着がトリガーとなりこれらの組織の障害により不安定性を生じ脊椎の破壊を生じると推測されている。しかしながら分子生物学的な解析を行った報告は少なく、その病態はいまだ解明されていない。そのため破壊性脊椎関節症の予防・治療法は現在のところ存在せず、強い痛みや麻痺を生じた場合神経の除圧や脊椎を固定する手術治療が行われている。さらに病変の進行を予測する方法もないため予後の予測ができず、手術法の選択においても確立された基準がない。破壊性脊椎関節症の病態を明らかにすることは、新たな治療法の開発や病変進行の予後予測による手術法の確立など患者にとって大きな福音となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は透析患者の椎間板、靭帯、関節包といった脊椎を構成する組織の解析により、破壊性脊椎関節症の病態を明らかにすることである。特に腎不全に伴い蓄積するアミロイドや advanced glycation end products (AGEs)、AGEs に特異的に結合するレセプター (RAGE) に焦点をおいて解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 画像評価

破壊性脊椎関節症はこれまで主に単純レントゲンで評価されてきたが、より正確な診断のために CT 画像による評価を行った。腰椎手術を行った透析および非透析患者の CT 画像を比較し、破壊性脊椎関節症の CT 画像による分類を行い、破壊性脊椎関節症の有病率を評価した。また破壊性脊椎関節症発症に関わる患者背景を評価した。

(2) サンプルの採取および組織染色

腰椎手術を要する透析患者およびコントロールとして非透析患者を対象とし、手術操作で廃棄する組織を採取した。腰部脊柱管狭窄症の手術により摘出される椎間板、黄色靭帯、関節包を使用した。腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯は肥厚し、特に背側で組織の変化が強いことが知られており、腹側と背側に分けて評価を行った。組織染色、遺伝子およびタンパク解析のため、採取した椎間板、黄色靭帯、関節包組織から mRNA の抽出および組織切片の作成を行った。アミロイドの評価のため direct fast scarlet (DFS) 染色を行い、また透析アミロイドの原因タンパクである 2 ミクログロブリンの染色を行った。

(3) 遺伝子解析

定量 PCR により遺伝子の発現を網羅的に評価した。線維化、軟骨化生、タンパク分解酵素等の他、特に AGEs、RAGE に着目し RAGE 関連炎症カスケードに関与する因子の評価を行った。

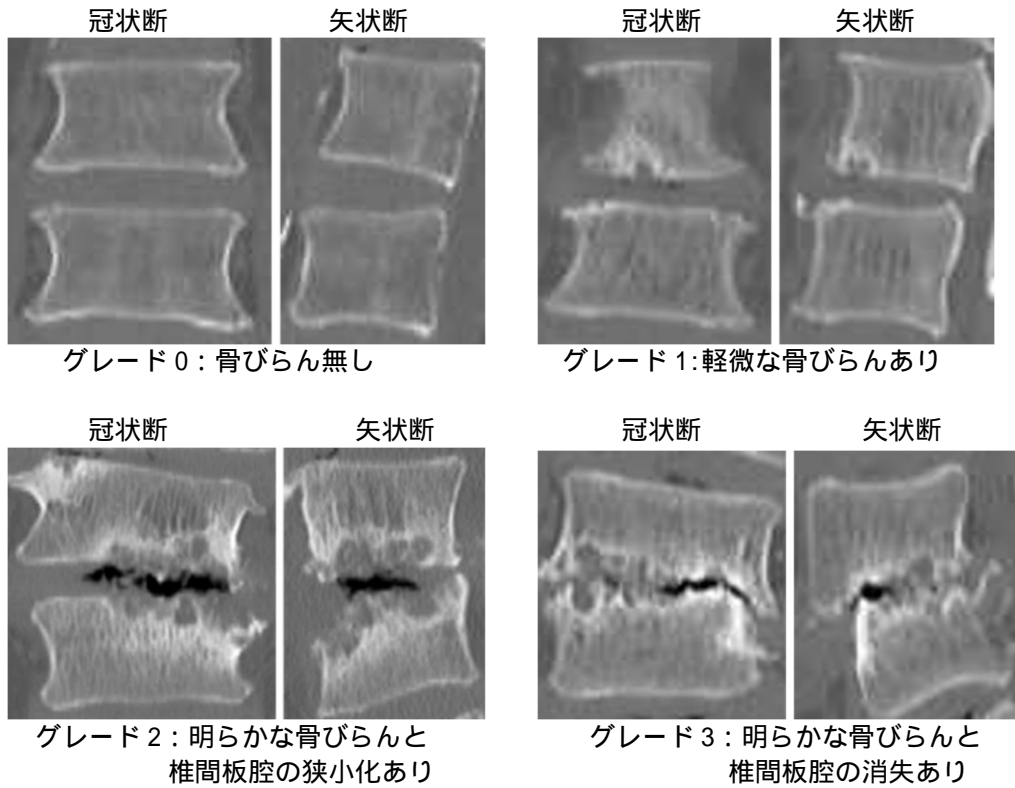
(4) タンパク解析

RAGE 関連炎症カスケードに着目し、免疫染色によりタンパクの発現を評価した。また high-performance liquid (HPLC) 法により AGEs のサブタイプを同定し定量した。

4. 研究成果

(1) 過去 4 年間に腰椎手術を行った透析患者 128 名のうち、腰椎の手術歴がある (43 名)、感染または骨折の手術を受けた (15 名)、手術前に CT を撮っていない (3 名) 者を除いた 67 名の画像 (335 椎間) と、対象として同じ期間に腰椎手術を行った非透析患者 193 名の CT 画像 (965 椎間) を評価した。透析患者腰椎の矢状断および冠状断の CT 画像により終板及び椎間板腔を評価し、以下の 4 つのグレード (グレード 0: 骨びらんなし、グレード 1: 軽微な骨びらんあり、グレード 2: 明らかな骨びらんと椎間板腔の狭小化あり、グレード 3: 明らかな骨びらんと椎間板腔の消失あり) に分類した (図 1)。明らかな骨びらんのあるグレード 2, 3 を破壊性脊椎関節症と定義すると、31 椎間 (9.3%) が破壊性脊椎関節症に分類され、21 名 (31.3%) の透析患者に破壊性脊椎関節症がみられた。CT 画像は骨の変化を鋭敏にとらえることができ、破壊性脊椎関節症のより正確な診断につながる可能性が示された。また統計学的有意差はなかったが、破壊性脊椎関節症のある患者は透析期間が長い傾向にあり、透析により除去されない 2 ミクログロブリンの蓄積によりアミロイドが形成され、破壊性脊椎関節症を生じると考えられた。

図1：CT画像による破壊性脊椎関節症のグレード分類



(2) 採取した椎間板、黄色靱帯、関節包組織から mRNA の抽出を行った。黄色靱帯からは十分な量の mRNA が抽出されたが、椎間板、関節包からは少量しか抽出されず、細胞成分が少ないことが要因として考えられた。また組織染色においても、黄色靱帯はほぼ一塊に摘出されるのに対して、椎間板、関節包は手術において一部しか摘出されず、DFS 染色のばらつきが大きかった。そのため以後黄色靱帯の評価を中心に実験を進めた。黄色靱帯では 2 ミクログロブリン由来のアミロイドは透析群のみでみられた(図2)。またアミロイドの沈着は変性の強い黄色靱帯の背側でより強くみられた(図3)。アミロイドは炎症や変性を生じた組織に沈着するとされ、腰椎の動きに伴い黄色靱帯組織が損傷され、より変化の強い背側にアミロイドが沈着したと考えられた。破壊性脊椎関節症の発症に腰椎の可動性による機械的ストレスが関与している可能性が示された。

図2：黄色靱帯の 2 ミクログロブリン由来のアミロイド沈着

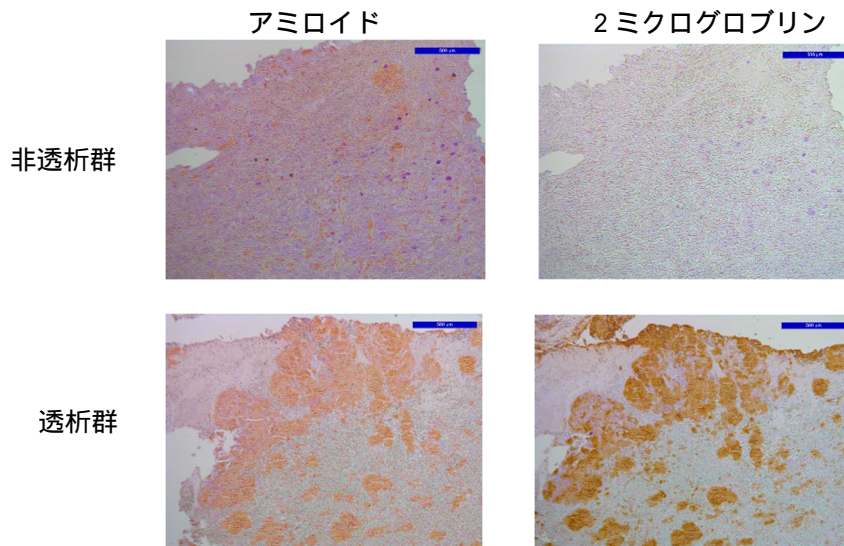
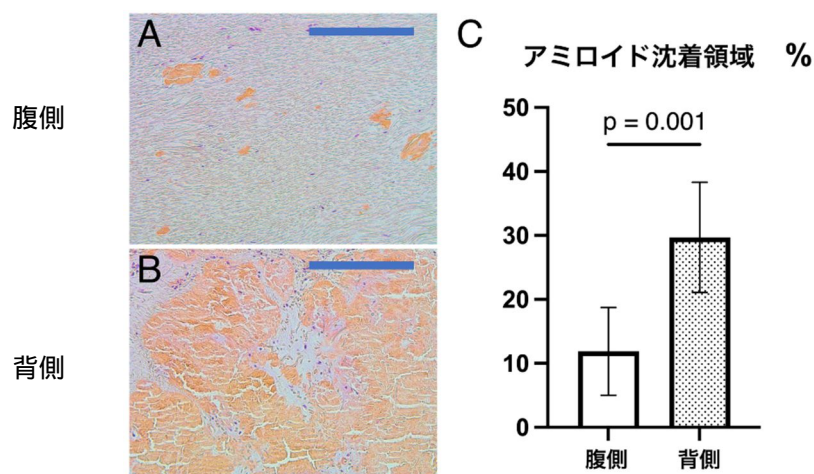


図 3：透析群黄色韧带アミロイド沈着領域の腹背側の比較



(3) 定量 PCR では黄色韧带の背側において透析群で線維化、タンパク分解酵素および RAGE 関連炎症カスケードに関わる因子の増加がみられた (表 1)。一方黄色韧带の腹側では有意な差はみられなかった。2 ミクログロブリンは AGEs と結合しアミロイドを形成するとされ、黄色韧带の背側に沈着したアミロイドにより RAGE 関連炎症カスケードが促進され、組織の変性をさらに促進すると考えられた。アミロイド沈着による破壊性脊椎関節症発症の機序に RAGE 関連炎症カスケードが関与している可能性がある。

表 1：定量 PCR (黄色韧带の背側)

	非透析患者群	透析患者群	P 値
炎症			
COL1A1	3.46 ± 7.54	11.72 ± 29.87	0.043
CYR61	0.59 ± 0.40	1.31 ± 0.97	0.014
タンパク分解酵素			
MMP-1	0.66 ± 0.45	1.32 ± 0.82	0.023
MMP-3	0.64 ± 0.51	1.34 ± 1.41	0.017
MMP-13	0.57 ± 0.36	1.25 ± 1.04	0.002
MMP-14	0.66 ± 0.53	1.14 ± 0.53	0.009
TIMP-3	0.59 ± 0.55	1.65 ± 1.62	0.009
RAGE 関連炎症カスケード			
RAGE	1.24 ± 0.89	2.53 ± 1.22	0.003
HMGB1	1.34 ± 1.19	2.58 ± 1.35	0.005
TLR2	1.31 ± 1.18	2.85 ± 1.86	0.005
NF-kB	1.25 ± 0.91	2.76 ± 1.80	0.01
ICAM-1	1.17 ± 0.85	2.14 ± 1.28	0.016
VCAM-1	1.35 ± 1.15	2.41 ± 1.46	0.04
IL-6	1.34 ± 1.00	3.19 ± 2.30	0.013
IL-1	1.33 ± 1.10	2.26 ± 1.22	0.025
TNF-	0.95 ± 0.76	2.14 ± 1.52	0.025

(4) 免疫染色では透析群で RAGE、HMGB-1、NF-kB といった RAGE 関連炎症カスケードに関わる因子が増加していた (図 4)。HPLC 法による AGEs の評価では、カルボキシメチルリジン (CML) は両群で有意差がなかったが、ペントシジンは透析群で増加していた。透析患者に蓄積する 2 ミクログロブリンアミロイドに結合する AGEs の主成分はペントシジンである可能性が示された。

図 4 : RAGE 関連炎症カスケードに関わる因子の免疫染色

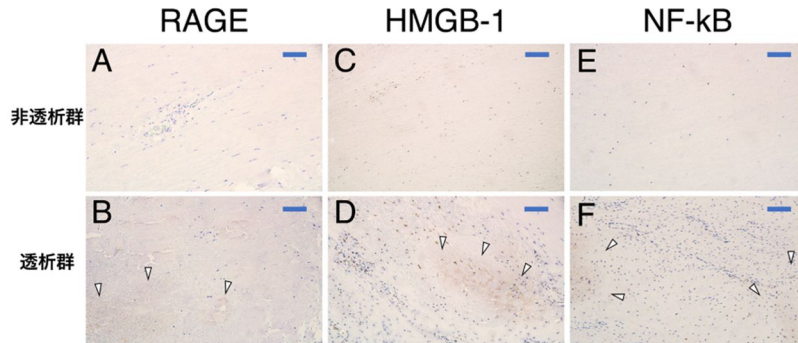
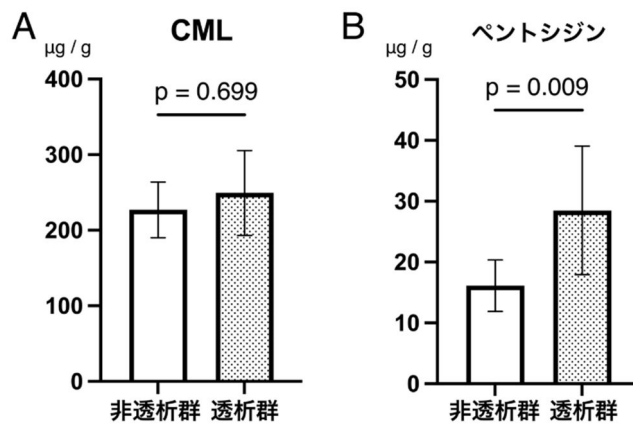


図 5 : HPLC 法による AGEs の定量



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yabe Y, Hagiwara Y, Tsuchiya M, Onoda Y, Yoshida S, Onoki T, Ishikawa K, Kurosawa D, Murakami E.	4. 巻 47(14)
2. 論文標題 Factors associated with thickening of the ligamentum flavum on magnetic resonance imaging in patients with lumbar spinal canal stenosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 1036-1041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/BRS.0000000000004341.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yabe Y, Hagiwara Y, Tsuchiya M, Minowa T, Takemura T, Hattori S, Yoshida S, Onoki T, Ishikawa K.	4. 巻 5(4)
2. 論文標題 Comparative proteome analysis of the ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JOR Spine	6. 最初と最後の頁 e1210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jsp2.1210.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yabe Y, Ishikawa K, Kurosawa D, Murakami E, Aizawa T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Buckling of the Ligamentum Flavum in Patients with Lumbar Spinal Canal Stenosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川圭佑、矢部裕、大野木孝嘉、小野田祥人、萩原嘉廣、相澤俊峰
2. 発表標題 透析患者における黄色靭帯肥厚の病態解析
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川 圭佑、矢部 裕、萩原 嘉廣、相澤 俊峰
2. 発表標題 64. 2ミクログロブリンアミロイドとRAGE関連炎症カスケードが透析患者の黄色靭帯に与える影響
3. 学会等名 第38回日整会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢部裕、萩原嘉廣、大野木孝嘉、石川圭佑、相澤俊峰
2. 発表標題 62. 網羅的なタンパク解析による黄色靭帯肥厚の病態解明
3. 学会等名 第96回日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	萩原 嘉廣 (Hagiwara Yoshihiro) (90436139)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------